

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23792313

研究課題名（和文） 副甲状腺ホルモン受容体 PTHR1 の発現抑制による口腔癌転移の制御

研究課題名（英文） Downregulation of Parathyroid Hormone Receptor 1 expression suppresses tumor metastasis in oral cancer.

研究代表者

宮下 仁 (MIYASHITA HITOSHI)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：70372323

研究成果の概要（和文）：

- I. 口腔癌細胞株において PTHR1 の発現を mRNA、蛋白レベルで検出した。これらの発現量は口腔扁平上皮細胞と比較し有意に高レベルであった。
- II. 一方で口腔癌高転移株群と低・非転移株群との間では、PTHR1 発現レベルの有意差は認められなかった。
- III. 口腔癌組織における免疫染色でも正常組織と比較し PTHR1 の高発現が認められた。
- IV. 更に転移症例において非転移症例と比較し PTHR1 発現量は有意に高レベルであった。
- V. PTHR1 高発現口腔癌細胞株を樹立した。この内 PTHrP の発現量が高い PTHR1 高発現株では細胞増殖速度の増大が認められた。

研究成果の概要（英文）：

- I. We examined the expression of PTHR1 mRNA and protein in oral cancer cell lines. PTHR1 is overexpressed in oral cancer cells.
- II. Comparing PTHR1 expression level, no correlation was found between oral cancer cell lines with high metastatic potential and those with low or non metastatic one.
- III. And cancer cells were strongly positive for PTHR1 staining in oral cancer clinical samples.
- IV. Moreover, the expression level of PTHR1 in cases with metastasis is higher than that of those with non metastasis.
- V. We established PTHR1 overexpressed oral cancer cell lines. The cell lines with high expression of PTHrP showed rapid growth.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌、遺伝子、転移、ホルモン受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) PTHR1 の locus は 3p22-p21.1 であり、副甲

状腺ホルモン PTH により血清 Ca 濃度の恒常性が維持されている一方、腫瘍産生性 PTHrP

の結合により高 Ca 血症が引き起こされる誘因となっている。

(2) PTHR1 の変異は内軟骨腫の責任遺伝子である (*Nat Genet* 2002)。内軟骨腫は悪性転化して軟骨肉腫になる場合がある。

(3) 近年乳癌において PTHR1 及び PTHrP が共発現している場合、骨転移しやすく予後が悪いという報告がされた。更に骨転移症例では PTHR1 が高発現している事、癌細胞の分裂を促進する事も解明され、骨肉腫でも高発現 PTHR1 により進行が促進することが報告された。更に大腸・胃・卵巣・前立腺の癌や黒色腫でも PTHR1 の高発現が免疫染色で確認されている

<これまでの研究成果>

(1) ヒト口腔癌症例において PTHR1 近傍のマイ遺伝子欠失 (LOH) や MSI 解析を詳細に行い、LOH が 30% の割合で見られることを報告した (*Mol Med Rep* 2008)。

(2) 口腔癌の我々の LOH 解析でも 3p 領域の LOH が報告されており (*Mol Med Rep* 2008、*Oncolo Rep* 2001)、発癌に中心的に関わる locus として認知されているが今回の結果はこれを裏付けるものであると同時に、残りの症例では PTHR1 近傍の欠失はみられず発現、機能していることを示唆するものであった。

2. 研究の目的

口腔癌のリンパ節転移は高頻度で認められ、骨転移等の遠隔転移が認められることも多いが、口腔癌における PTHR1 の発現は現在まで報告されておらず、正常組織との発現レベルの差異を含めその意義、癌の転移能との関連については今尚不明のままである。そこで本課題によりその解明を目指そうとするに至った。

<研究の具体的目的>

(1) 「口腔癌細胞の増殖および転移における PTHR1-PTHrP の分子機構の解明」

① 正常組織と癌細胞とにおける PTHR1 の発現比較、PTHR1 高発現の癌細胞株を樹立し、その発現量と細胞増殖との関連性についての検討を行う

② 高転移及び低・非転移株における PTHR1 と PTHrP との共発現について比較する

③ PTHR1 高発現癌細胞株をマウスに移植早期に転移するかどうかを検討する

(2) 「PTHR1 の発現と活性の阻害により、口腔癌細胞の転移制御を目指す」

ことが最終な目的である。

3. 研究の方法

(1) 最初に正常組織と癌細胞における PTHR1 の発現を mRNA 及び蛋白レベルで定量比較する。

(2) 次に高転移株と非・低転移株における PTHR1 の発現量の差異を検討する。PTHR1 高発現癌細胞株を樹立し増殖速度及び転移能とその分子機構について解析する。即ち、同株における PTHrP の発現レベルの変化と、PTHR1 と PTHrP の共発現により増殖活性や転移能が増大するかどうかについて vitro と vivo で解析する。

(3) 癌における PTHR1 の発現を RNAi にて抑制した場合の、転移制御の可能性を探索する。

① ヒト口腔正常組織と口腔癌における PTHR1 の発現の定量的解析を行い比較する。

・ control : 口腔扁平上皮及び歯肉線維芽細胞
・ cell : HSC-2, 3, SAS, SAT, CA9-22, OSC-19, 20
Real time RT-PCR で mRNA 量を、ウエスタンブロッティングと免疫染色にて蛋白量を定量し、上記 2 群間の発現量を比較する。

② PTHR1 高発現口腔癌細胞株を樹立後、PTHrP の発現量を定量し細胞増殖能について評価を行う

③ ノドマウスに移植可能なヒト口腔癌細胞株でも PTHR1 高発現株を樹立し、これをノドマウスに移植し、原発巣から早期に転移を来すかどうか、その転移能について検討する
・ 本学所有の、ノドマウスに移植可能なヒト口腔癌細胞株 (HNC-3JCK, LJC-1-JCK, OCC-1-JCK, PNC-1-JCK) 4 株を用いて PTHR1 高発現癌細胞株を樹立する。

・ これをノドマウスに皮下注射し、コントロール群と比較して PTHrP の発現量を定量後、細胞増殖速度及び転移を生じるまでの期間と、転移範囲及び骨やリンパ節を含む転移臓器の特異性についての検討を行う。

④ RNAi を用いた PTHR1 の発現・活性の抑制による癌転移の制御

・ PTHR1 高発現癌細胞株に対して、RNAi にて PTHR1 の発現と活性を抑制する。その後、コントロール群と比較しその細胞増殖速度及び転移能が抑制されるかどうかを比較する
・ 更に PTHR1 の抑制が、既に転移を起こした癌細胞に対しても奏功しその進行を制御するかどうかについても検討する。

⇒ これにより口腔癌転移における PTHR1 の意義と PTHR1-PTHrP の分子機構を in vitro、vivo の両面から解明することが出来ると思われる。

4. 研究成果

(1) 口腔癌細胞株において PTHR1 の発現を mRNA、蛋白レベルで検出した。これらの発現量は口腔扁平上皮細胞と比較し有意に高レベルであった。

(2) 一方で口腔癌高転移株群と低・非転移株群の間では、PTHR1 発現レベルの有意差は認められなかった。

(3) 口腔癌組織における免疫染色でも正常組織と比較し PTHR1 の高発現が認められた。

(4)更に転移症例において非転移症例と比較し PTHR1発現量は有意に高レベルであった。
 (5)PTHR1高発現口腔癌細胞株を樹立した。この内PTH r Pの発現量が高いPTHR1高発現株では細胞増殖速度の増大が認められた。



Fig. 1. PTHR1 expression in oral cancer cell line. Cell lysate was loaded and probed with anti-human PTHR1 antibody (85 kd), with β -actin (42 kd) as an internal control.

Fig. 1.
 口腔癌細胞株におけるPTHR1蛋白の発現

【結論】

(1)口腔癌組織においても正常組織と比較し PTHR1の高発現が確認された。更に転移症例における発現は非転移症例と比較し有意に高レベルであった。
 (2)PTHR1高発現口腔癌細胞株において、PTH r Pの発現量がupした細胞株では細胞増殖速度の上昇が認められた。

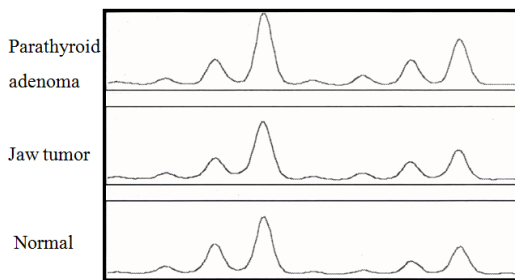


Fig.2. LOH analysis of the microsatellite marker D11S480 on chromosome 11q12.3 in the parathyroid adenoma and jaw tumor

Fig. 2.
 顎骨腫瘍と副甲状腺腫瘍におけるMEN1近傍のLOH解析
 (Tohoku. Univ. Dent. J 2012)

Table 1. LOH analysis of the MEN1 and PTHR2 in Jaw Tumor and Parathyroid Adenoma

Gene	Position	Locus	Sample	
			Jaw tumor	Parathyroid adenoma
MEN1	11q12.3	D11S480	○	○
	11q12-q13.2	PYGM	○	○
HRPT2	1q31.3	D1S412	△	△
	1q21.1	D1S422	○	○

○ Normal
 △ Non-informative

Table 1.
 顎骨腫瘍におけるMEN1とHRPT2のLOH解析結果
 (Tohoku. Univ. Dent. J 2012)

【以後の研究展開】

(1)PTHR1高発現口腔癌細胞株をヌードマウスに移植し、細胞増殖速度及び転移能について検討する。
 (2)次にRNAiにてPTHR1活性を抑制しこれらが制御されるかどうか検討後、転移巣に対してもPTHR1のRNAiが奏功するかどうか検討する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Hitoshi Miyashita et. al.
 "Genetic analysis of the MEN1 and HRPT2 in jaw tumor and parathyroid adenoma associated with familial hyperparathyroidism"
Tohoku Univ. Dent. J. 査読有、31、2012、55-61

〔学会発表〕(計4件)

1. 八島 望, 宮下 仁 et. al.
 “長時間におよぶ顔面頸部手術におけるROTEM(rotation thromboelastometry)の臨床経験”
 日本麻酔科学会北海道・東北支部第2回学術集会、2012年9月1日、札幌

2. 佐藤 工, 宮下 仁 et. al.
 “下顎臼歯部に発生した嚢胞腺癌の1例”
 第56回日本口腔外科学会総会、2011年10月1日、大阪

3. 渡邊夕紀子, 森 士朗, 阪本真弥, 宮下 仁, 小玉哲也 et al
 “頭頸部癌遺伝子治療に向けたナノバブルと超音波によるNIS遺伝子導入と124I-PETイメージング”

第 35 回 日本頭頸部癌学、2011 年 6 月 1 日、
愛知

4. 李麗, 森 士朗, 宮下 仁, 森川秀広,
阪本真弥, 小玉哲也 et al
“頭頸部癌所属リンパ節転移の診断・治療に
向けたリンパ節腫大マウスを用いたリンパ節
転移モデルの開発”
第 35 回 日本頭頸部癌学、2011 年 6 月 1 日、
愛知

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 仁 (MIYASHITA HITOSHI)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：70372323

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：